棕尾别麻蝇金属硫蛋白的分离纯化及性质分析

吴国星,李　凯,叶恭银*,**胡　萃,程家安**

(浙江大学应用昆虫学研究所,杭州　310029)

摘要: **将棕尾别麻蝇** *Boettcherisca peregrina* **幼虫置于含** 800 μg/g $CdCl_2$ **的食物中取食** 48 h **后,可诱导金属硫蛋白**(MT)**的合成。诱导处理后的幼虫匀浆上清液经** Sephadex G-50 **分子筛柱、**UNO™ Q1 **阴离子交换柱和** Bio-Gel P-6 **脱盐柱层析,纯化得到** 2 **个亚型,即** MT-Ⅰ **和** MT-Ⅱ。MT-Ⅰ **和** MT-Ⅱ **的分子量均为** 9 kD,**每蛋白分子均含** 7 **个** Cd **和** 20 **个巯基,且具** 254 nm **的** Cd-SH **特征吸收肩。两者的氨基酸组成中,以半胱氨酸含量最高,分别为** 36.6% **和** 31.8%;**而芳香族氨基酸和组氨酸含量甚少,约** 1% ~ 2%。

关键词: **棕尾别麻蝇;金属硫蛋白;分离纯化;性质分析;氨基酸组成**

中图分类号: Q966　　文献标识码: A　　文章编号: 0454-6296(2006)01-0022-07

Isolation, purification and characterization of metallothioein from *Boettcherisca peregrina* (Diptera: Sarcophagidae)

WU Guo-Xing, LI Kai, YE Gong-Yin*, HU Cui, CHENG Jia-An (Institute of Applied Entomology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: The metallothioneins (MT) in *Boettcherisca peregrina* larvae were induced and produced after their feeding on the dietary containing 800 μg cadmium chlorides per gram diet for 48 hours. Two forms of MTs (MT-Ⅰ and MT-Ⅱ) were isolated and purified from the supernatant of the whole body homogenates from the larvae after exposure to cadmium chlorides, using gel chromatography on Sephadex G-50, ion-exchange chromatography on UNO™ Q1, and desalination on Bio-Gel P-6. Molecular weight for both MT-Ⅰ and MT-Ⅱ was 9 kD. Both MT-Ⅰ and MT-Ⅱ contained 7 cadmium atoms and 20 sulfhydryl groups per molecule, and showed the spectral characteristic of cadmium-thionein, *i.e.* a broad shoulder at 254 nm. As to amino acid composition, the content of cysteine residues was the highest, accounting for 36.6% and 31.8% of all amino acids for MT-Ⅰ and MT-Ⅱ respectively; however, the contents of aromatic amino acid and histidine were very low, just sharing 1% – 2% of all amino acids.

Key words: *Boettcherisca peregrine*; metallothionein; isolation and purification; characterization analysis; amino acid composition

金属硫蛋白(metallothionein, MT)是一类低分子量的富含半胱氨酸且可被重金属、激素和各种细胞因子诱导的金属结合蛋白。其功能包括微量元素储存、运输、代谢,重金属解毒,拮抗电离辐射,清除羟基自由基等。自 Margoshes 和 Vallee(1957)首次从马肾脏中分离出镉金属硫蛋白(Cd-MT)以来,有关微生物、植物和动物金属硫蛋白的性质与功能等已得到了广泛的、不同程度的研究。相对而言,有关昆虫金属硫蛋白的研究则较薄弱。虽然,不少学者已证明金属硫蛋白或金属结合蛋白存在多种昆虫中,如摇蚊 *Chironomus yoshimatsui* (Yamamura *et al.*, 1983)、石蝇 *Eusthenia spectabilis* (Everard and Swain, 1983)、棕尾别麻蝇 *Boettcherisca* (*Sarcophaga*) *peregrina* (Aoki *et al.*, 1984)、德国小蠊 *Blatella germanica* (Bouquegneau *et al.*, 1985)、黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (Lastowski-Perry *et al.*, 1985; Mokdad *et al.*, 1987)、蜉蝣 *Baetis thermicus* (Suzuki *et al.*, 1989)、家蝇 *Musca domestica* (Kasai *et al.*,

基金项目:国家自然科学基金重点项目(30230070)

作者简介:吴国星,男,1975 年生,山东临沂人,博士研究生,从事昆虫生理生化及分子生物学研究,E-mail: wugx1@163.com

* 通讯作者 Author for correspondence, E-mail: chu@zju.edu.cn

收稿日期 Received: 2005-04-28;接受日期 Accepted: 2005-08-22

1993；Niu *et al*.，2000）、弹尾虫 *Orchesella cincta*（Hensbergen *et al*.，1999）以及家蚕 *Bombyx mori*（何秀萍等，2000）。但是，对它们性质与功能的认识还是相当有限的。迄今，除明确了黑腹果蝇（Lastowski-Perry *et al*.，1985；Mokdad *et al*.，1987）和弹尾虫（Hensbergen *et al*.，1999）金属硫蛋白的一级结构外，对其他则无任何研究。究其原因可能与研究过程中未分离纯化得到金属硫蛋白有关。为此，我们在前人有关棕尾别麻蝇幼虫体内金属硫蛋白积累、分布与分泌（Aoki and Suzuki，1984；Aoki *et al*.，1984）等研究的基础上，对该蝇金属硫蛋白的分离纯化与生化特性作较系统的研究，为今后深入分析其结构与功能关系等奠定良好基础。

1　材料与方法

1.1　虫源

供试棕尾别麻蝇是室内饲养多年的品系。幼虫用人工饲料（麦麸∶水∶猪肝 = 3∶5∶6）在 25℃和 L12∶D12 的光周期条件下饲养，成虫饲喂水和食用砂糖。

1.2　金属硫蛋白适宜诱导条件的确定

1.2.1　诱导条件：在 25℃和 L12∶D12 的光周期条件下，以含有 0、50、100、200、400、800 μg/g $CdCl_2$ 的饲料分别喂饲 2 日龄幼虫。于处理后 24、48、72、96 和 120 h，自各处理随机取 10 头幼虫，排空 24 h 后用蒸馏水洗净，贮存于 －70℃的超低温冰箱中，供幼虫体内金属硫蛋白含量测定。实验重复 3 次。

1.2.2　金属硫蛋白的粗提：参照任育红等（2002）方法，将收集各幼虫样品分别置于 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液（含有 0.25 mol/L 蔗糖，100 mmol/L 2-巯基乙醇，pH 8.6）中匀浆，于 4℃下 10 000 × g 离心 10 min，收集上清液。上清液经沸水浴加热 2 ~ 3 min，再于 4℃下 10 000 × g 离心 20 min，收集上清液。加入 3 倍体积 －20℃ 预冷的无水乙醇于上清液中，置 －20℃过夜、沉淀。尔后，于 4℃下 12 000 × g 离心 20 min。取沉淀，加 5 mL 的 0.01 mol/L Tris-HCl 缓冲液（pH 8.6）混匀、溶解，再于 4℃下 15 000 × g 离心 20 min，收集上清液，即得金属硫蛋白粗提液。

1.2.3　金属硫蛋白含量的测定：参照 Klein 等（1990）的镉血红蛋白（Cd-Hb）饱和法。在 100 μL 金属硫蛋白粗提液中分别加入 600 μL 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液（pH 8.6）和 100 μL 20 μg/mL $CdCl_2$ 溶液，混匀。然后，加入 100 μL 2 % 牛血红蛋白（Hb），混匀，静置 10 min。接着置沸水浴中加热 2 ~ 3 min，再于 4℃下 12 000 × g 离心 10 min，收集上清液。再加入 2 % 牛血清蛋白 100 μL，混匀，静置 10 min，沸水浴中加热 2 ~ 3 min，12 000 × g 离心 10 min，得上清液。最后，用原子吸收分光光度计（AA100，Perkin Elmer）测定上清液中 Cd^{2+} 含量。因金属硫蛋白螯合有 Cd^{2+}，这样金属硫蛋白含量越高，其螯合的 Cd^{2+} 含量也越高，故以 Cd^{2+} 含量表示金属硫蛋白的相对含量。

综合分析对比各 Cd^{2+} 处理浓度与处理时间中虫体内金属硫蛋白含量，确定诱导金属硫蛋白产生的适宜条件。

1.3　金属硫蛋白的分离纯化

将适宜条件下诱导处理后洗净的幼虫先移入置于冰浴中的玻璃匀浆器中，加 2 倍体积的 10 mmol/L Tris-HCl 缓冲液 A（含 0.25 mmol/L PMSF，100 mmol/L 2-巯基乙醇，pH 8.6），匀浆。然后，匀浆液于 4℃下以 25 000 × g 离心 20 min。取上清液，置 80℃恒温水浴处理 3 min 以除去热不稳定蛋白，用冰水冷却，再于 4℃下以 25 000 × g 离心 10 min，取 5 mL 上清液上柱分离，剩下的分装后贮存于 －70℃冰箱中。

分离纯化以 Biologic DuoFlow™ 蛋白层析系统（Bio-Rad 公司）进行，具体步骤如下：首先，将上清液上样于预先以缓冲液 A 平衡的 Sephadex G-50 凝胶柱（2.5 cm × 100 cm），用同样的缓冲液洗脱，流速 0.4 mL/min，4 mL/管收集流出液。分别以波长 254 nm 和 280 nm 检测每收集管的紫外吸收值，同时，以原子吸收分光光度计测定每管 Cd^{2+} 浓度。其次，收集 $A_{254} > A_{280}$ 和 Cd^{2+} 浓度均高的分离组分，再上样于预先经缓冲液 A 平衡的 UNO™ Q1 阴离子交换层析柱（7 cm × 35 mm，Bio-Rad 公司），进行离子交换层析，样品上完后先用 4 倍体积的缓冲液 A 进行预洗，然后改用含 0 ~ 1 mol/L NaCl 的缓冲液 A 进行线性梯度洗脱，流速 1 mL/min，0.5 mL /管进行收集。再次，收集所要的洗脱峰（$A_{254} > A_{280}$ 和 Cd^{2+} 含量均高的组分），将其冷冻浓缩至约 1 mL，再上样于预先经 10 mmol/L NH_4HCO_3 平衡的 Bio-Gel P-6 分离柱（1 cm × 30 cm，Bio-Rad 公司）进行脱盐。最后，对所得金属硫蛋白组分进行冷冻干燥并测定浓度。

1.4　金属硫蛋白的性质分析与鉴定

1.4.1　分子量测定：按 King 和 Laemmli（1971）方法以 SDS-PAGE 不连续体系（15% 分离胶，4% 浓缩胶）进行电泳，然后用考马斯亮蓝 R_{250} 染色，脱色液（甲醇∶冰醋酸∶水 = 1∶1∶8）脱色。尔后，以 GS-800 凝胶成像系统（Bio-Rad）进行电泳图像扫描，并用 Quantity

one 蛋白分析软件分析金属硫蛋白的分子量。

1.4.2 螯合镉原子数的测定：取一定量金属硫蛋白纯化样品溶于少量 0.01 mol/L Tris-HCl 溶液，然后用原子吸收分光光度计测定溶液中 Cd^{2+} 浓度。用 Bradford（1976）法测定溶液蛋白浓度，并根据 SDS-PAGE 电泳法测得的金属硫蛋白分子量计算出每分子金属硫蛋白结合 Cd^{2+} 的摩尔数。

1.4.3 巯基含量测定：用 Ellman 方法测定巯基含量（Riddles *et al*., 1979）。取一定量金属硫蛋白样品，配成 50 μL 溶液，加入 10 μL 的 1.2 mol/L HCl 和 200 μL 的 0.1 mol/L EDTA，反应 10 min 脱去金属。加入 200 μL Ellman 试剂（含 5 mmol/L DTNB，1 mmol/L EDTA，6 mol/L 盐酸胍，0.1 mol/L PBS，pH 7.2），混匀 3 min 使金属硫蛋白变性后与 DTNB 形成黄色络合物，用 0.1 mol/L PBS，pH 7.2 稀释，用紫外分光光度计（UV-2550，日本岛津公司）在 412 nm 处测紫外光吸收值。巯基浓度（C，mol/L）计算公式为：$C = DA/\varepsilon$，式中 D 为稀释倍数，A 为吸收值，$\varepsilon = 1.42 \times 10^4$ L/(mol·cm)。再根据巯基浓度和金属硫蛋白的摩尔浓度计算每分子棕尾别麻蝇金属硫蛋白含巯基的量。

1.4.4 氨基酸组成分析：将纯品溶于 6.0 mol/L HCl 中，真空条件下 110℃ 水解 24 h，用高效液相色谱（Agilent 1100，安捷伦公司）分析水解产物中氨基酸的组成，并计算氨基酸相对百分含量。其中色谱柱为 Zorbax Eclipse AAA（安捷伦公司），激发光波长和测定光波长分别为 340 nm 和 450 nm。

1.4.5 紫外吸收特征光谱测定：取一定量金属硫蛋白样品溶于 0.01 mol/L Tris-HCl 溶液，将待测样品适当稀释，分装于 2 个管中。其中一管直接以紫外分光光度计（UV-2550，日本岛津公司）进行 190 ~ 300 nm 的紫外扫描。另一管加入 HCl 使其终浓度为 0.05 mol/L，通过酸化作用制备脱辅基蛋白（Byrd *et al*., 1988），然后在同样的波长区内进行紫外扫描。分析金属硫蛋白脱辅基前后的紫外吸收特征光谱。

2 结果与分析

2.1 金属硫蛋白适宜诱导条件的确定

Cd^{2+} 浓度对其诱导棕尾别麻蝇幼虫体内所产生金属硫蛋白的相对含量（以 Cd^{2+} 含量表示）有极显著地影响（$F = 59.48$，$P < 0.01$），Cd^{2+} 浓度越高，诱导产生金属硫蛋白的相对含量越高；但是，诱导时间对 Cd^{2+} 诱导产生金属硫蛋白的相对含量则无显著影响（$F = 1.47$，$P > 0.05$）（图 1）。综合分析各处理所诱导产生金属硫蛋白的含量，并结合考虑较短的幼虫饲养时间以提高时效，确定金属硫蛋白的适宜诱导条件为 Cd^{2+} 浓度 800 μg/g，诱导处理时间 48 h。

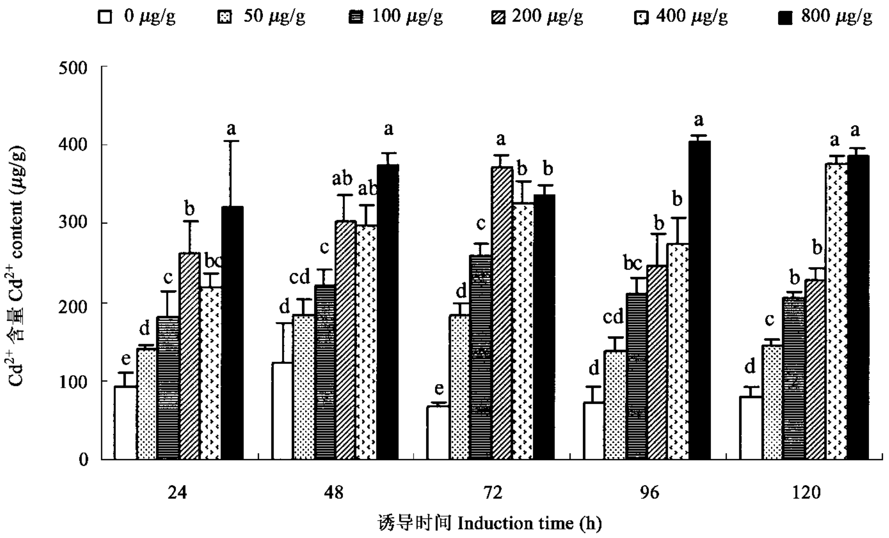

图 1 不同浓度 Cd^{2+} 诱导棕尾别麻蝇幼虫后其体内金属硫蛋白的相对含量

Fig. 1 The relative content of metallothionein in *Boettcherisca peregrina* larvae after exposure to cadmium with different concentrations for different times

图中数据为平均值 ± 标准差，同一诱导时间具不同小写字母的数值间差异达显著水平（$P < 0.05$，Duncan 新复极差多重比较）。

Data are mean ± *SD* ($n = 3$). The columns with different small letters for the same exposure time are significantly different ($P < 0.05$, Duncan's multiple range tests).

2.2 金属硫蛋白的分离与纯化

Cd^{2+} 诱导处理的棕尾别麻蝇幼虫匀浆上清液经凝胶过滤 Sephadex G-50 柱层析分离后的层析图谱如图 2 所示。从紫外吸收检测及 Cd^{2+} 浓度检测结果综合分析可知，第 2 个峰含金属硫蛋白组分，其中可能还包含了一些分子量和性质与金属硫蛋白相似的杂蛋白，有待进行下一步的分离。经 UNO™ Q1 阴离子交换柱分离（图 3），可得到 2 个蛋白亚峰，分别命名为 MT-Ⅰ和 MT-Ⅱ。这两个亚峰的 Cd^{2+} 浓度测定结果表明，MT-Ⅰ和 MT-Ⅱ富含 Cd^{2+}，且 254 nm 处吸收值明显高于 280 nm 处的吸收值。分别收集 MT-Ⅰ峰和 MT-Ⅱ峰，将其冷冻浓缩，然后上样于 Bio-Gel P-6 柱脱盐。用此法，可从 50 g 幼虫中纯化得到 6 mg 左右的 Cd-MT。

2.3 金属硫蛋白的性质分析与鉴定

2.3.1 SDS-PAGE 电泳结果显示，棕尾别麻蝇幼虫的 2 个金属硫蛋白亚型的分子量相同，均为 9 kD（图 4）。

2.3.2 螯合 Cd 原子数：MT-Ⅰ溶液中蛋白浓度为 76.8 μg/mL，Cd^{2+} 浓度为 6.9 μg/mL，再根据 MT-Ⅰ分子量 9 kD 计算得出每分子 MT-Ⅰ 约结合 7.2 个镉原子。MT-Ⅱ 溶液中蛋白浓度为 66.2 μg/mL，Cd 的

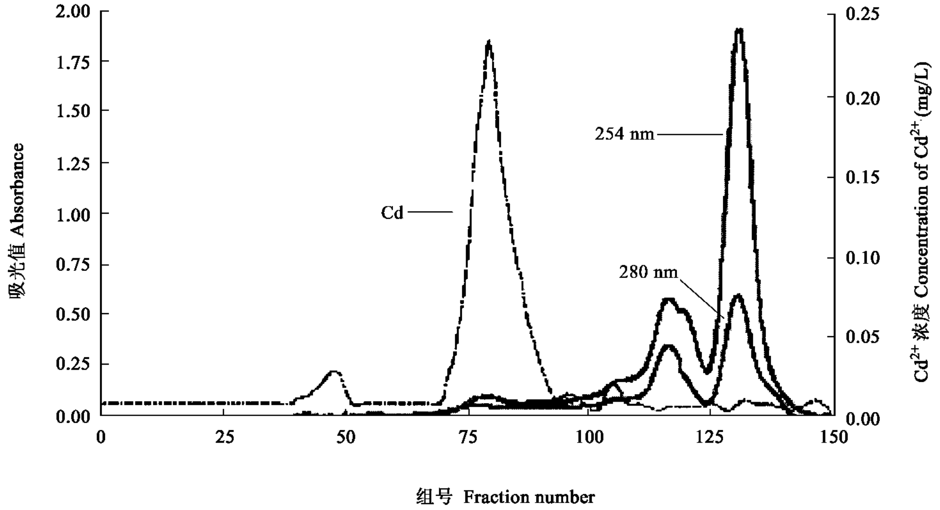

图 2　经 Cd^{2+} 诱导处理的棕尾别麻蝇幼虫匀浆上清液的 Sephadex G-50 柱层析图

Fig. 2　Gel filtration profile of homogenate supernatant of *Boettcherisca peregrina* larvae after exposure to cadmium on a Sephadex G-50 column

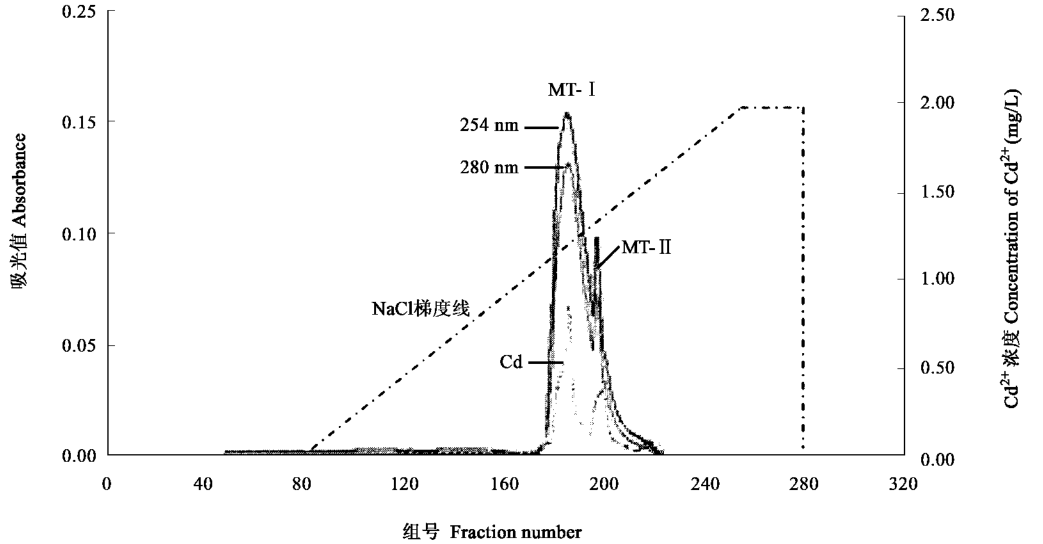

图 3　Sephadex G-50 凝胶过滤分离产物经 UNO™ Q1 离子交换柱的层析图

Fig. 3　Ion-exchange chromatography of fractions from Sephadex G-50 gel filtration on a UNO™ Q1 column

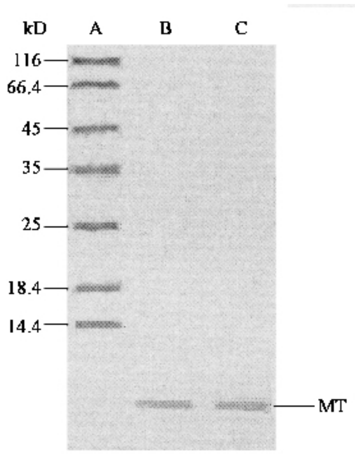

图 4 棕尾别麻蝇金属硫蛋白(MT)分子量的 SDS-PAGE 分析

Fig. 4 Molecular weight determination of the metallothioeins (MT-Ⅰ and MT-Ⅱ) from *Boettcherisca peregrine* by SDS-PAGE

A:蛋白质标准分子量 Marker;B:MT-Ⅰ;C:MT-Ⅱ.

浓度为 5.7 μg/mL,再根据测得的 MT-Ⅱ分子量 9 kD 计算得出每分子 MT-Ⅱ 约结合 6.9 个镉原子。可见,2 个金属硫蛋白亚型的每个分子中约含有 7 个 Cd 原子。

2.3.3 巯基含量:蛋白浓度为 0.04 μmol/L 的 MT-Ⅰ经脱金属加入巯基试剂反应后,根据其 412 nm 处紫外光吸收值计算得巯基浓度为 0.81 μmol/L,从而得出每分子 MT-Ⅰ 中约含 20 个巯基。同样,蛋白浓度为 0.03 μmol/L 的 MT-Ⅱ 经脱金属加入巯基试剂反应后,根据其 412 nm 处紫外光吸收值计算得巯基含量为 0.59 μmol/L,得出每分子 MT-Ⅱ约含 20 个巯基。可见,金属硫蛋白的 2 个亚型均为典型的巯基蛋白质,且均约含 20 个巯基。

2.3.4 氨基酸组成分析:MT-Ⅰ大约由 83 个氨基酸组成,其中半胱氨酸含量最高,占 36.6%;其次为甘氨酸,占 24.0%;芳香族和杂环族氨基酸含量最少。MT-Ⅱ大约由 80 个氨基酸组成,其中半胱氨酸含量最高,占 31.8%,其次为甘氨酸,占 19.8%;芳香族和杂环族氨基酸含量最少;MT-Ⅰ和 MT-Ⅱ的氨基酸组成种类相同,但具体到某种氨基酸在含量上则略有差异(表 1)。

2.3.5 紫外吸收特征光谱测定:190~300 nm 紫外扫描的结果表明,金属硫蛋白两个亚型在 A_{254} 附近均有明显的紫外吸收肩(图 5),即为二价 Cd 与硫酯键(Cd-SH)的典型吸收特征;因芳香族氨基酸微量,在 A_{280} 附近没有明显的紫外吸收肩。而脱辅基金属硫蛋白(Apo-MT)由于二价 Cd-SH 键断裂导致 A_{254} 附近紫外吸收肩消失,这一特性与镉硫金属簇的紫外吸收特性相符。

3 讨论

金属硫蛋白是一类低分子量(6~12 kD),高金属含量(每分子含 7~12 个金属原子),富含半胱氨酸(约占 30%)的具很强热稳定性的蛋白。它因缺乏或少含芳香族氨基酸和组氨酸而没有一般蛋白的 280 nm 特征吸收或仅呈现该波长的弱吸收,其特征吸收则依赖其巯基与所结合的金属而异,如与 Cd^{2+}

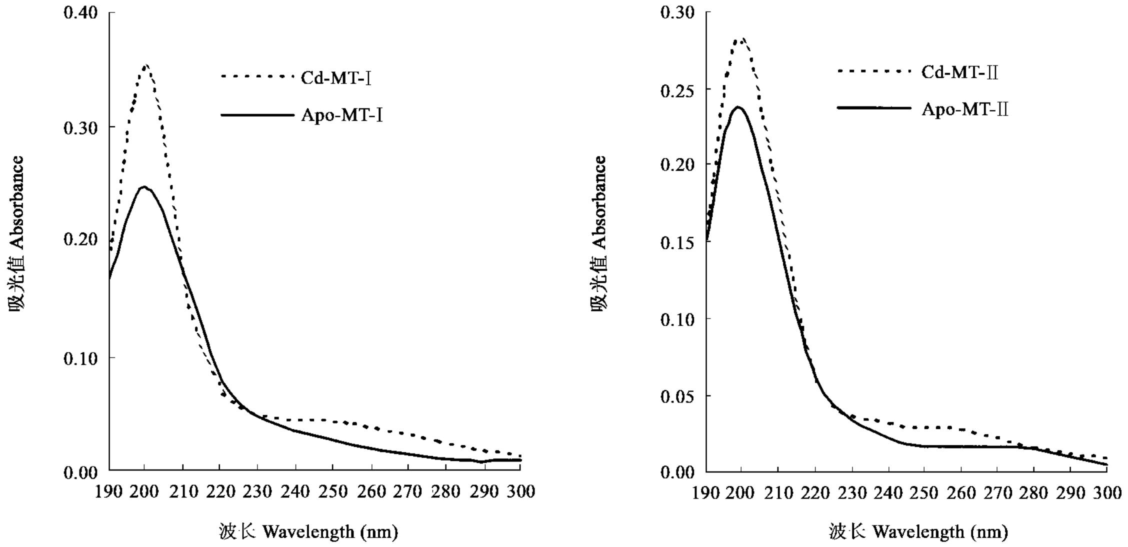

图 5 棕尾别麻蝇金属硫蛋白的紫外吸收光谱

Fig. 5 Ultraviolet absorption spectra of the metallothioeins (MT-Ⅰ and MT-Ⅱ) from *Boettcherisca peregrine*

表 1　棕尾别麻蝇金属硫蛋白的氨基酸组成

Table 1　Amino acid composition of the metallothioeins（MT-Ⅰ and MT-Ⅱ）from *Boettcherisca peregrine*

氨基酸 Amino acid		MT-Ⅰ		MT-Ⅱ	
		相对含量 Relative quantity (%)	残基数 Probable number of residues	相对含量 Relative quantity (%)	残基数 Probable number of residues
脂肪族氨基酸 Aliphatic amino acids	半胱氨酸 Cys	36.6	27.1 (27)	31.8	23.7 (24)
	丝氨酸 Ser	2.5	2.1 (2)	2.8	2.4 (2)
	苏氨酸 Thr	1.9	1.4 (1)	2.3	1.7 (2)
	甲硫氨酸 Met	0	0 (0)	0	0 (0)
	甘氨酸 Gly	24.0	28.8 (29)	19.8	23.7 (24)
	丙氨酸 Ala	2.2	2.2 (2)	3.0	3 (3)
	缬氨酸 Val	1.7	1.3 (1)	2.6	2 (2)
	亮氨酸 Leu	2.3	1.6 (2)	3.1	2.1 (2)
	异亮氨酸 Ile	1.2	0.9 (1)	1.5	1 (1)
	天冬氨酸 Asp	4.3	2.9 (3)	6.2	4.2 (4)
	谷氨酸 Glu	4.3	2.6 (3)	6.4	3.9 (4)
	赖氨酸 Lys	2.8	1.7 (2)	4.1	2.5 (3)
	精氨酸 Arg	11.0	5.7 (6)	9.0	4.7 (5)
芳香族氨基酸 Aromatic amino acids	苯丙氨酸 Phe	1.4	0.8 (1)	2.0	1.1 (1)
	酪氨酸 Tyr	1.4	0.7 (1)	1.7	0.8 (1)
	色氨酸 Trp	0	0 (0)	0	0 (0)
杂环族氨基酸 Heterocyclic amino acids	组氨酸 His	1.0	0.6 (1)	2.0	1.2 (1)
	脯氨酸 Pro	1.4	1.1 (1)	1.8	1.4 (1)
总量 Total		100	81.5 (83)	100	79.6 (80)

注 Note：括号内数据为氨基酸残基数的邻近整数 The data in the brackets means the nearest integer of probable number of amino acid residues.

结合则具 254 nm 特征吸收（Kagi，1991；Kojima，1991）。本实验就是根据金属硫蛋白这一基本特性，通过对经 Cd^{2+} 诱导处理的棕尾别麻蝇幼虫匀浆上清液的热变性、Sephadex G-50 分子筛过柱、UNO™ Q1 阴离子交换等步骤，并结合对分离组分的 Cd^{2+} 含量和 254 nm 特征吸收蜂的检测而获得了具 254 nm 特征吸收的高 Cd^{2+} 含量的 2 个组分。由此，可初步断定它们就是棕尾别麻蝇的金属硫蛋白。对这 2 个分离纯化组分的分子量、螯合金属原子数、氨基酸组成及紫外吸收谱特征等性质的分析表明，分子量为 9 kD，属于低分子量蛋白，半胱氨酸含量为 30%左右，螯合有 7 个 Cd 原子，具有二价 Cd 与硫酯键结合而产生 254 nm 特征吸收，即进一步证实了它们具有金属硫蛋白的一般特性。因此，本实验分离纯化的 2 个组分确实就是棕尾别麻蝇金属硫蛋白的 2 个亚型，即 MT-Ⅰ和 MT-Ⅱ。至于这 2 个亚型的区分可能与其所带核电荷数的差异有关。

就棕尾别麻蝇 MT-Ⅰ和 MT-Ⅱ的半胱氨酸含量而言，两者均为 30%左右，这与人（Kagi，1991）、黑腹果蝇（Mokdad *et al*.，1987）、家蝇（Kasai *et al*.，1993）及弹尾虫（Hensbergen *et al*.，1999）的金属硫蛋白相似。就两者的芳香族氨基酸和组氨酸含量而言，为 1% ~ 2%，这明显不同于不含这类氨基酸的人、黑腹果蝇及弹尾虫的金属硫蛋白，而与家蝇金属硫蛋白（Kasai *et al*.，1993；Niu *et al*.，2000）相似。就棕尾别麻蝇 MT-Ⅰ和 MT-Ⅱ的分子量，两者均为 9 kD，与人的 6 ~ 7 kD（Kagi，1991）、黑腹果蝇 4.555 kD 的 Mtn 和 5.281 kD 的 Mto（Mokdad *et al*.，1987）、家蝇的 5.225 kD（Kasai *et al*.，1993）或 9.045 kD / 11.560 kD（Niu *et al*.，2000），及弹尾虫的 7.128 kD（Hensbergen *et al*.，1999）相比，虽都系小分子蛋白，但具体到分子量大小还是有明显差异的。不论从氨基酸组成，还是分子量大小的比较均可见，不同生物体金属硫蛋白的性质是不完全相同的，显示有一定多样性，这也在一定程度上反映了不同生物体具有相应特定的金属硫蛋白，以满足其对重金属适宜或实现某种特定功能的需要。具体究竟如何，则有待在系统研究各类生物体金属硫蛋白结构与功能间关系的基础上方能定论。

此外，需要指出的是有关人（Kagi，1991）、黑腹果蝇（Lastowski-Perry *et al*.，1985）及弹尾虫（Hensbergen *et al*.，1999）的金属硫蛋白一级结构分析显示，Cys-X-Cys 系金属硫蛋白典型序列。就棕尾别麻蝇金属硫蛋白究竟如何，还有待进一步研究确证。

参考文献（References）

Aoki Y，Suzuki KT，1984. Excretion of cadmium and change in the relative ratio of iso-cadmium-binding proteins during metamorphosis of fleshfly (*Sarcophaga peregrina*). *Comp. Biochem. Physiol.*，78C：315－317.

Aoki Y，Suzuki KT，Kubota K，1984. Accumulation of cadmium and induction of its binding protein in the digestive tract of fleshfly (*Sarcophaga peregrina*) larvae. *Comp. Biochem. Physiol.*，77C：279－282.

Bouquegneau JM，Ballan-Dufrancais C，Jeantet AY，1985. Storage of Hg in the ileum of *Blatella germanica*：characterization of metallothionein. *Comp. Biochem. Physiol.*，80C：95－98.

Bradford MM，1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principal of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*，72：248－254.

Byrd J，Berger RM，McMillin DR，Wright CF，Hamer D，Winge DR，1988. Characterization of the copper-thiolate cluster in yeast metallothionein and two truncated mutants. *J. Biol. Chem.*，263：6 688－6 694.

Everard LB，Swain R，1983. Isolation，characterization and induction of metallothionein in the stonefly *Eusthenia spectabilis* following exposure to cadmium. *Comp. Biochem. Physiol.*，75C：275－280.

He XP，Cai XR，Huai WH，Zhang BR，2000. Cloning and expression of metallothionein gene of *Bombyx mori*. *Acta Microbiol. Sin.*，40(4)：384－388. [**何秀萍，蔡向荣，怀文辉，张博润**，2000. **桑蚕金属硫蛋白基因在大肠杆菌中的克隆和表达**. **微生物学报**，40(4)：384－388]

Hensbergen PJ，Donker MH，Van Velzen MJM，Roelofs D，Van der Schors RC，Hunziker PE，Van Straalen NM，1999. Primary structure of a cadmium-induced metallothionein from the insect *Orchesella cincta* (Collembola). *Eur. J. Biochem.*，259：197－203.

Kagi JHR，1991. Overview of metallothionein. *Method Enzymol.*，205：613－626.

Kasai T，Watanabe T，Inoue K，Hasegawa T，1993. Purification and some properties of metal-bindings proteins in housefly larvae (*Musca domestica*). *Biosci. Biotech. Biochem.*，57(11)：1 873－1 887.

King J，Laemmli UK，1971. Polypeptides of the tail fibres of bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.*，62(3)：465－477.

Klein DK，Bartsch R，Summer KH，1990. Quantitation of Cu-containing metallothionein by a Cd-saturation method. *Anal. Biochem.*，189：35－39.

Kojima Y，1991. Definition and nomenclature of metallothionein. *Method Enzymol.*，205：8－10.

Lastowski-Perry D，Otto E，Maroni G，1985. Nucleotide sequencing and expression of a *Drosophila* metallothionein. *J. Biol. Chem.*，260：1 527－1 530.

Margoshes M，Vallee BL，1957. A cadmium protein from equine kidney cortex. *J. Amer. Chem. Soc.*，79：1 813－1 814.

Mokdad R，Debec A，Wegnez M，1987. Metallothionein genes in *Drosophila melanogaster* constitute a dual system. *Proc. Natl. Sci. USA*，79：2 658－2 662.

Niu CY，Lei CL，Hu C，2000. Studies on a cadmium induced metallothionein in housefly larvae，*Musca domestica*. *Entomologica Sinica*，7(4)：351－358.

Ren YH，Yang JH，Wu JT，Liu YP，Ru BG，2002. Preliminary study on metallothionein-like of five kinds of algae. *Biotechnology*，11(6)：9－11. [**任育红，杨加华，吴江涛，刘玉鹏，茹炳根**，2002. 5 **种藻类金属硫蛋白的初步研究**. **生物技术**，11(6)：9－11]

Riddles PW，Blakeley RL，Zerner B，1979. Ellman's reagent：5，5′-dithiobis (2-nitrobenzoic acid) – a reexamination. *Anal. Biochem.*，94：75－81.

Suzuki KT，Sunaga H，Hatakeyama S，1989. Differential binding of cadmium and copper to the mayfly (*Baetis thermicus*) larvae. *Comp. Biochem. Physiol.*，94C：99－103.

Yamamura M，Suzuki KT，Hatakeyama S，1983. Tolerance to cadmium and cadmium binding proteins induced in the midge larvae，*Chironomus yoshimatsui*. *Comp. Biochem. Physiol.*，75C：21－24.

（责任编辑：黄玲巧）